

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-292795

(P2001-292795A)

(43) 公開日 平成13年10月23日 (2001. 10. 23)

(51) IntCl ⁷	識別記号	F I	テグート* (参考)
C 1 2 Q	1/26	C 1 2 Q	1/26
G 0 1 N	21/78	G 0 1 N	21/78
	33/52		33/52
	33/64		33/64
	33/66		33/66
			A
			B
			A

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L 外国語出願 (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願2001-49366 (P2001-49366)

(22) 出願日 平成13年2月23日 (2001. 2. 23)

(31) 優先権主張番号 5 1 3 0 7 1

(32) 優先日 平成12年2月25日 (2000. 2. 25)

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 596159500

ライフスキャン・インコーポレイテッド

Lifescan, Inc.

アメリカ合衆国、95035 カリフォルニア

州、ミルピタス、ジブラルター・ドライブ

1000

(72) 発明者 チャンメイ・オーヤン

アメリカ合衆国、95035 カリフォルニア

州、ミルピタス、スベリオール・ロード

773

(74) 代理人 100066474

弁理士 田澤 博昭 (外 1 名)

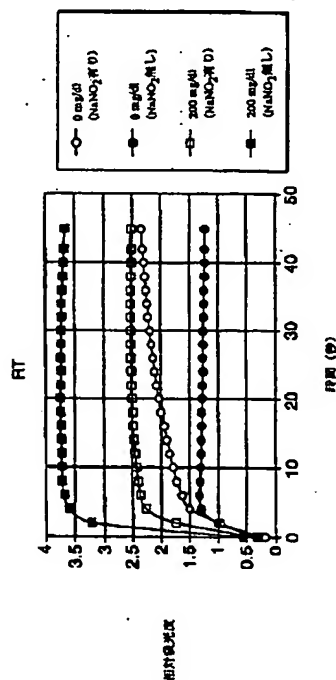
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 テトラゾリウム化合物に基づく診断

(57) 【要約】

【課題】 ヘモグロビンの還元作用による分析物の測定
の障害をなくす。

【解決手段】 試薬は、全血等のヘモグロビンを含む
生物学的液体に含まれる分析物の濃度を測定するの
に適している。試薬は、分析物に対する特異性を有するフ
ラビン依存性酵素と、フラビンがフラビン依存性酵素に
結合していない場合のみ含まれるフラビン補因子と、テ
トラゾリウム染料前駆体と、電子転移剤と、亜硝酸塩と
を含む。試薬は、分析物濃度の判断基準となる色素形成
を生ずる。亜硝酸塩はヘモグロビンによって非酵素的に
生ずる邪魔な染料形成を抑制する。さらに、該試薬は全
血に含まれるグルコースを測定するための乾燥細片で使
用される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヘモグロビンを含む生物学的液体に含まれる分析物の濃度を測定するための試薬であって、

- a) 前記分析物に対する特異性を有し、かつフラビンが結合したフラビン依存性酵素と、
- b) テトラゾリウム染料前駆体と、
- c) 電子転移剤と、
- d) 亜硝酸塩を含むことを特徴とする試薬。

【請求項2】 ヘモグロビンを含む生物学的液体に含まれる分析物の濃度を測定するための試薬であって、

- a) 前記分析物に対する特異性を有し、かつフラビンが結合していないフラビン依存性酵素と、
- b) フラビンモノヌクレオチド (FMN) 又はフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) と、
- c) テトラゾリウム染料前駆体と、
- d) 電子転移剤と、
- e) 亜硝酸塩を含むことを特徴とする試薬。

【請求項3】 ヘモグロビンを含む生物学的液体に含まれる分析物の濃度を測定するための乾燥試薬細片であって、請求項1の試薬からなる被覆物を有する試験用

パッドが設けられた支持層を有する乾燥試薬細片。

【請求項4】 ヘモグロビンを含む生物学的液体に含まれる分析物の濃度を測定するための乾燥試薬細片であって、請求項2の試薬からなる被覆物を有する試験用

パッドが設けられた支持層を有する乾燥試薬細片。

【請求項5】 ヘモグロビンを含む生物学的液体に含まれる分析物の濃度を測定するための乾燥試薬細片であって、

試験用パッドと該試験用パッドに積層された最上層とが設けられた支持層を備え、請求項1の試薬の第1の部分

が前記試験用パッド上にあり、前記試薬の第2の部分が前記支持層及び／又は前記最上層上にあることを特徴とする乾燥試薬細片。

【請求項6】 ヘモグロビンを含む生物学的液体に含まれる分析物の濃度を測定するための乾燥試薬細片であって、試験用パッドと該試験用パッド上に積層された最上層とが設けられた支持層を有し、請求項2の試薬の第1の部分

が前記試験用パッド上にあり、また前記試薬の第2の部分が前記支持層及び／又は前記最上層上にある乾燥試薬細片。

【請求項7】 ヘモグロビンを含む生物学的液体に含まれるグルコースの濃度を測定するための乾燥試薬細片であって、

- a) 支持層と、
- b) 前記支持層上に設けられ、かつ、
- i) フラビンが結合したグルコース酸化酵素と、
- ii) テトラゾリウム染料前駆体と、
- iii) PMS 又は該 PMS の類似体を含む被覆物を有する試験用パッドと、
- c) 前記試験用パッド上に設けられ、かつ亜硝酸塩によ

って被覆された吸収性の最上層とを含むことを特徴とする乾燥試薬細片。

【請求項8】 ヘモグロビンを含む生物学的液体に含まれるグルコースの濃度を測定するための乾燥試薬細片であって、

- a) 支持層と、
- b) 前記支持層上に設けられ、かつ、
- i) フラビンが結合していないフラビン依存性酵素と、
- ii) FMN 又は FAD と、
- iii) テトラゾリウム染料前駆体と、
- iv) PMS 又は該 PMS の類似体を含む被覆物を有する試験用パッドと
- c) 前記試験用パッド上に設けられ、かつ亜硝酸塩によって被覆された吸収性の最上層とを含むことを特徴とする乾燥試薬細片。

【発明の詳細な説明】

【0001】 先願との相互参照これは、同時係属米国特許出願一連番号第09/282,083号(1999年3月30日出願)の一部継続出願である。なお、米国特許出願一連番号第09/282,083号(1999年3月30日出願)は、現在は米国特許第5,902,731号となっている米国特許出願一連番号09/161,876(1998年9月28日出願)の一部継続出願である。

【0002】

【発明の属する技術分野】 この発明は、ヘモグロビンを含む生物学的液体の分析物濃度の測定を可能とする診断組成物に関する。この組成物は、テトラゾリウム染料前駆体を主成分とし、ヘモグロビンによって誘導される該組成物の還元を抑制する。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 脂肪組織は、体内においてエネルギー貯蔵の最も豊富な形態の1つである。脂肪組織に蓄えられた脂肪酸が循環系に放出され、肝臓によって主に代謝される。そのプロセスにおいて、脂肪が消費されてエネルギーが放出され、該エネルギーが体内で利用可能となる。一般に、脂肪はほとんど分解されず、脂肪酸は二酸化炭素と水とに完全に代謝されるが、この変換によって身体のデリケートなpHバランスが崩れるようなことはない。しかし、体内の炭水化物量が、例えば食事制限で不十分である場合、脂肪が消費されて脂肪酸の量が潜在的危険をはらむレベルまで増加可能となる。また食事制限者に加えて、インシュリン依存性の患者が害を受けやすい。なぜならインシュリン依存性患者は炭水化物代謝に欠陥を有するからである。体内のエネルギー要求を満たすために過剰の脂肪酸が使用されると、大量のアセトアセテート、アセトン、及びβ-ヒドロキシブチレートが生ずる。これらの中間体はケトン体と呼ばれ、その症状はケトアシドーシスとして知られている。

【0004】ケトン体は一般に身体によって他の形態に再利用されるので、ケトン体が体内に溢れるわけではない。したがって、健康な個体では、それらの分析物の蓄積は無視できる程度の量である。大量の脂肪が比較的短期間で代謝されている場合、又は殆どのエネルギーが脂肪に由来する場合、膨大な量のケトン体が産生される。それらの脂肪代謝物の過剰な産生は、もしそのような異常が速やかに正されなければ、ある種の神経疾患を引き起こす。

【0005】ケトン体は血液中に存在し、もし閾値を超えると尿を介して排出される。ケトン体は、現在の臨床分析機器によって容易に検出される。平均して、 β -ヒドロキシブチレート、アセトアセテート、及びアセトンの比率は、それぞれ78%、20%、及び2%である。濃度が相対的に低く、かつ揮発性が高いことから、アセトンはめったに検出されない。その代わり、アセトアセテートはニトロプルシド反応によって定量的に判定され、また β -ヒドロキシブチレートは酵素的方法によって定量化される。アセトアセテート試験片が何十年にもわたって利用されている。アセトアセテート試験片は、アルデヒド及びケトンとのニトロプルシドイオン結合反応にもとづいている。アルカリ性尿試料又は血清検体を数分間にわたってニトロプルシドと反応させると紫色になる。この色の強度がアセトアセテートの濃度を示す。しかし、アセトンがその試験を妨害するので、読み取られる値が高くなる。さらに、患者がケトアシドーシス症状の出現から回復すると、尿及び血中のアセトアセテート濃度が増加するので診断が困難となる。

【0006】 β -ヒドロキシブチレート試験は、ケトン体濃度をモニタする上でより一層有用である。この試験は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)補因子の存在下で、対応するデヒドロゲナーゼによる β -ヒドロキシブチレートの酸化に基づいている(厳密に言えば、D- β -ヒドロキシブチレートだけが天然に存在して酸化されるが、この明細書の発明の詳細な説明及び特許請求の範囲においては記載を簡略化するためにD- β -ヒドロキシブチレートからD-を省き β -ヒドロキシブチレートと記すことにする)。酸化によってNADHが産生され、その濃度は紫外線スペクトルフォトメータによって直接測定される。したがって、スペクトルにおける対応する信号変化は、分析物の濃度に比例する。残念なことに、NADHの励起は紫外線領域で起こるため、このような検出方法は実験用測定機器のみに適している。 β -ヒドロキシブチレートをモニタするための別の方法は、NADHをテトラゾリウム化合物によって酸化させる方法である。

【0007】テトラゾリウム化合物は、一般に強塩基及び光に対する感受性が高い。したがって、そのような化合物の完全性を確かめるために特別の注意を払わなければならない。しかし、テトラゾリウムは組織代謝の研究

において重要な役割を果たしてきた。例えば、この種の化合物は細胞内での無気呼吸酸化及び還元反応に使用されてきた。さらに、テトラゾリウム化合物は一般に臨床診断に使用される。また、テトラゾリウム化合物は一般に明るい色又は無色の化合物であり、還元剤の存在下で還元反応を起こして、色が濃くなったホルマザンを生成する。還元剤、例えばアスコルビン酸塩、スルフィドリル、又はNADHの変種、NADPHの変種、PQQH₂(還元PQQ-ピロキノリンキノン)の変種、FMNH₂(還元FMN-フラビンモノヌクレオチド)、及びFADH₂(還元FAD-フラビンアデニンジヌクレオチド)の変種は染料を形成することが可能である。

【0008】臨床診断では、嫌気性反応において親化合物であるNAD(P)⁺からのNAD(P)Hの生成を観察する上で、そのような染料が非常に重要であることが知られている(例えば、D. Be11他に対して1994年11月1日に発行された米国特許第5,360,595号を参照されたい)。酸化還元反応は急速に行われ、また酸素に対する感受性が低い。結果として生ずる染料の色は非常に濃く、また水に対する溶解性が低い。

【0009】基本的に、テトラゾリウム染料前駆体は全血液中に含まれるケトン体及びグルコースの測定に使用することができる。しかし、ヘモグロビンが血液の赤血球に含まれていない場合、テトラゾリウムがヘモグロビン(Fe(II))によって非酵素的に還元され、色が付いたホルマザンが形成される。したがって、遊離ヘモグロビンは測定に対して深刻な影響を及ぼす。実際、溶血及びそれによって生ずる遊離ヘモグロビンが対象分析物に対して大量であるために、一般的なケトン体測定では、ヘモグロビンからの妨害信号が目的とする信号を上回ることがある。これに対して、グルコース測定は、特に通常の濃度では悪影響を受けることはない。ただし、ヘモグロビン酸化反応が速くなるようなヘマトクリット値が高い試料で、又は高温下で反応が起こると、上記と同様に、グルコース測定に対する妨害が著しくなる。遊離酸素が生ずる赤血球細胞の溶血を容易に避けることはできないので、もし分析にテトラゾリウムを使用するならば、試験前に赤血球を除去しなければならない。

【0010】膜及びフィルターによる濾過、化学試薬による捕捉、又はそのような方法の組み合わせによって、試料から赤血球を除去することができる。血液全体から赤血球を分離するための濾過方法は、高価であり、また試料の量も幾分多く必要とする。血液試料全体から赤血球を除去するために濾過を用いる血液ケトン(β -ヒドロキシブチレート)試験の一例として、GDSダイアグノスティクス(GSDiagnostics, Elkhart, IN)から入手可能であるケトサイト(KetoSite(登録商標))試験が挙げられる(参考文献:Tietz Textbook of Clinical Chemistry 2nd Ed., ed. by C. Burtis et al., W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA, 1994年、第9

74頁)。その試験で使用する「テストカード (Test Card)」は2つのフィルター層を有するので幾分高価であり、必要とする血液試料の量も多い(25 μ L)。さらに、血液は溶血されたものであってはならない。

【0011】濾過と化学的捕捉との組み合わせは、マイルズ (Miles) から入手可能なアメスグルコメータエンコア (Ames (登録商標) Glucometer Encore (商標)) 血液グルコース細片で使用される。この細片は、フィルター材料からなる層と凝集助剤 (ポテトレクチン) とを用いて赤血球による妨害を排除する (チュー (Chu) 等のEP 0 638 805 A2 (1995年2月15日発行) を参照されたい)。

【0012】ヘモグロビンを酸化してメトヘモグロビンにするためにシステムに酸化剤を導入することは、ヘモグロビンによる妨害を少なくするための別の方法である。フェリシアニドがヘモグロビンをメトヘモグロビンに変換することが知られているが、フェリシアニドは所望の生成物であるNADHを破壊する。

【0013】パルマー (Palmer) 等のEPO 0 330 517 B2 (1989年8月20日発行) は、生化学的分析物を測定するための方法を開示している。この方法では分析物のある種の酸化酵素と反応させる。この酸化酵素は分析物に対して電子転移酵素活性を有しており、還元された酵素を発生させる。この酵素を比色定量分析することによって分析物の濃度が判定される。酵素反応は酸素に依存性しない。

【0014】1994年1月20日に発行されたフレイタグ (Freitag) 等のWO 94/01544は、分析物分析用の安定試薬を開示している。試薬は、酵素、フェナジン誘導体、テトラゾリウム塩、及び該試薬を安定化させる二価金属塩を含む。

【0015】1994年1月20日に発行されたストルホッフ (Storhoff) 等のWO 94/01578もまた、分析物分析用の安定試薬を開示している。試薬は、酵素、媒介物質、テトラゾリウム塩、及び該試薬を安定化させる酸化剤を含む。

【0016】

【課題を解決するための手段】本発明は、ヘモグロビンを含有する生物学的液体に含まれる分析物の濃度を測定するための試薬を提供する。この試薬は、a) 分析物に対する特異性を有し、かつフラビンが結合したフラビン依存性酵素と、b) テトラゾリウム染料前駆体と、c) 電子転移剤と、d) 亜硝酸塩とを含む。

【0017】本発明の別の実施形態では、上記試薬は、a) 分析物に対する特異性を有し、かつフラビンが結合していないフラビン依存性酵素と、b) フラビンモノヌクレオチド (FMN) 又はフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) と、c) テトラゾリウム染料前駆体と、d) 電子転移剤と、e) 亜硝酸塩とを含む。

【0018】上記試薬は、ヘモグロビンを含有する生物

学的液体に含まれる分析物の濃度を測定するための乾燥試薬細片を形成するために、1種類以上の基質に被覆されるのに特に適している。特に好ましい細片は、a) 支持層と、b) i) 分析物に対する特異性を有し、かつフラビンが結合したフラビン依存性酵素、ii) テトラゾリウム染料前駆体、及びiii) 電子転移剤を含む被覆物を有し、かつ支持層上に設けられた試験用パッドと、c) 亜硝酸塩によって覆われ、かつ試験用パッド上に設けられた吸収性の最上層とを含む。

【0019】本発明の別の細片は、a) 支持層と、b) i) 分析物に対する特異性を有し、かつフラビンが結合していないフラビン依存性酵素、ii) FMN又はFAD、iii) テトラゾリウム染料前駆体、及びiv) 電子転移剤を含む被覆物を有し、かつ支持層上に設けられた試験用パッドと、c) 亜硝酸塩によって覆われ、かつ試験用パッド上に設けられた吸収性の最上層とを含む。

【0020】

【発明の実施の形態】本発明は、分析物濃度の判断基準となるNADH、NAD(P)H、PQQH₂、FMNH₂、又はFADH₂といった補助因子の還元体の濃度を提示することによって、ヘモグロビンを含有する生物学的液体 (例えば、全血) に含まれる分析物の濃度を測定するための試薬を提供する。この試薬に亜硝酸塩が含まれることで、還元補助因子の濃度の測定に対するヘモグロビンの妨害を克服する。この試薬は、限定されるものではないが、ケトン体及びグルコースの測定に特に有用である。

【0021】図1は、本発明の典型的な試験用細片10を示すもので、該試験用細片10は支持体14上に固定された試験用パッド12を有する。支持体14は、ポリスチレン、ナイロン、又はポリエステル等のプラスチック、又は金属シート、又は当業者に知られている他の適当な材料のいずれかであってもよい。試験用パッド12は、分析物と反応して色の変化を生じさせる試薬によって被覆されている。試験用パッド12は、好ましくは吸収性材料、例えば濾紙又はポリマー膜である。しかし、反応が酸素を必要としないことから、試験用パッド12はプラスチックフィルム等の非吸収性材料であってもよい。試薬は、分析物に対して特異的な酵素、水素化物転移酵素、テトラゾリウム染料前駆体、適当な酵素補助因子、及びヘモグロビン抑制剤を含む。より一層安定化させるために、緩衝剤及び安定化剤が任意に含まれる。

【0022】図2に示すように、試験用パッド12上に最上層16を積層することで、試験用細片を多層構造とすることもできる。そのような構造では、試薬を二つの層に分けることも可能である。例えば、ヘモグロビン抑制剤で任意の最上層16を被覆し、該試薬の残りで試験用パッド12を被覆してもよい。好ましくは、最上層16は吸収性であり、過剰の試料を吸収するための吸収層及び塗布層として作用する。試料は最上層16に塗布さ

れ、さらに該最上層16を通過して試験用パッド12に達する。分析物濃度は、支持層14を介して色の変化を測定することによって判定される。あるいは、もし反応領域に隣接する支持層14が透明でなければ、任意の窓又はスルーホール18を介して色の変化を測定することによって判定される。

【0023】図3に示す別の実施形態では、スペーサ20によって最上層16と試験用パッド12とが隔てられている。スペーサ20は、好ましくは両面に接着性被覆物(図示せず)を有する非吸収性プラスチックフィルムである。スペーサ20の溝22は、試料が毛細管現象によって開口部24から測定領域26へ流れる経路を提供する。この試料の流れは、試験用パッド12の一面と隣接する層との間、あるいは任意の窓又は通気孔18から抜ける空気に依存する。測定領域26における色の変化は、任意の窓又は通気孔18を介して観察される。試薬は、全量が試験用パッド12上にあってもよく、あるいは試験用パッド12と非吸収性層14及び16の少なくとも一方と配分されてもよい。したがって、試薬の第1の部分(20)が試験用パッド12にあり、該試薬の第2の部分(20)が非吸収性層14及び16の少なくとも一方にあってもよい。なお、試薬が層の「上」又は層に「被覆」されていると言及する場合、試薬が層に吸収される可能性(特に層が吸収性である場合)が含まれることを意図している。

【0024】全てのフラビン依存性酵素がこの発明による分析に適している。適当な酸化酵素及びそれらに対応する分析物として、例えばアルコールに対してアルコール酸化酵素、グルコースに対してグルコース酸化酵素、ガラクトースに対してガラクトース酸化酵素、コレステロールに対してコレステロール酸化酵素、L-ラクテートに対してラクテート酸化酵素、尿酸に対して尿酸酸化酵素、ビリルビンに対してビリルビン酸化酵素、さらにコリンに対してコリン酸化酵素が挙げられる。適当な脱水素酵素及びそれらに対応する分析物として、例えばビルビン酸塩に対してビルビン酸脱水素酵素、D-乳酸塩に対して乳酸脱水素酵素、さらにコハク酸塩に対してコハク酸脱水素酵素が挙げられる。

【0025】酵素に結合していない場合、該酵素を活性化させるために補助因子が加えられなければならない。フラビン依存性酵素に対して加えられるべき補助因子として、例えばフラビンモノヌクレオチド(FMN)及びフラビンアデニンヌクレオチド(FAD)が挙げられる。酵素の存在下、分析物によって補助因子が還元される。

【0026】染色プロセスの次のステップは、電子転移剤による還元補助因子からの水素化物の分離である。適当な電子転移剤として、リボ酸脱水素酵素、フェレドキシン-NADP還元酵素、及びリポアミド脱水素酵素等のジアフォラーゼが挙げられる。フラビン補助因子が用

いられる場合、より好ましいものは、フェナジンメト硫酸塩(PMS)、フェナジンエト硫酸塩(PES)、1-メトキシフェナジンメト硫酸塩、又はメルドラブルー(Meldola Blue)といった酵素によらない電子転移剤である。反応速度及び安定性は、電子転移剤又は「水素化物分離剤」を選択するための本源的要素である。例えば、PMSは普遍的な水素化物分離剤である。なぜなら、PMSは以下に挙げたテトラゾリウム化合物の殆どに対して、比較的速い反応速度を有するからである。このことから、補助因子がPQQである場合はPMSが好ましい。しかし、PMSは酵素を主成分とする水素化物分離剤よりも光に対してより一層感受性が高い。ジアフォラーゼはより一層安定しており、このことから補助因子がNADである場合はジアフォラーゼが好ましい。

【0027】捕捉された水素化物は、テトラゾリウム化合物(染料前駆体)に受け渡されて、色付いたホルマゼンを形成する。この装置にとって最も好ましいテトラゾリウム化合物として、例えば2-(2'-ベンゾチアゾリル)-5-スチリル-3-(4'-フタルヒドラジリル)テトラゾリウム(BSPT)、2-ベンゾチアゾリル-2-3,5-ジフェニルテトラゾリウム(BTDP)、2,3-ジ(4-ニトロフェニル)テトラゾリウム(DNP)、2,5-ジフェニル-3-(4-スチリルフェニル)テトラゾリウム(DPSP)、ジスチリルニトロブルーテトラゾリウム(DSNBT)、3,3'-[3,3'-ジメトキシ-(1,1'-ビフェニル)-4,4'-ジイル]-ビス[2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル(-2H)テトラゾリウム(NBT)]、3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2Hテトラゾリウム(MTT)、2-フェニル-3-(4-カルボキシフェニル)-5-メチルテトラゾリウム(PCPM)、テトラゾリウムブルー(TB)、チオカルバミルニトロブルーテトラゾリウム(TCNBT)、テトラニトロブルーテトラゾリウム(TNBT)、テトラゾリウムバイオレット(TV)、2-ベンゾチアゾチアゾリル-3-(4-カルボキシ-2-メトキシフェニル)-5-[4-(2-スルフォエチルカルバモイル)フェニル]-2H-テトラゾリウム(WST-4)、及び2,2'-ジベンゾチアゾリル-5,5'-ビス[4-ジ(2-スルホエチル)カルバモイルフェニル]-3,3'-[3,3'-ジメトキシ-4,4'-ビフェニレン]ジテトラゾリウム、ジナトリウム塩(WST-5)がある。生物学的試料と適合するように、好ましくは水溶性染料前駆体、より好ましくはWST-5が用いられる。さらに、WST-5が使用される場合、結果として生ずるホルマゼン化合物は紫-青領域で強いスペクトル吸収を示すので、ヘモグロビンからのバックグラウンド信号を補正する必要性を減少させる。

【0028】最後に、ヘモグロビンとテトラゾリウム化

合物との間の不要な染料形成反応を抑えるために、ヘモグロビン抑制剤が試薬に存在する。ヘモグロビン抑制剤の役割は、ヘモグロビンを酸化してメトヘモグロビンにすることであり、メトヘモグロビンはテトラゾリウム又はホルマザンと反応しない。驚くべきことに、亜硝酸ナトリウム、亜硝酸カリウム、及びそれらの誘導体等の亜硝酸塩はヘモグロビンを抑制する点で非常に効果的であり、その一方で還元された補助因子（例えばNADH、PQQH₂、FMNH₂、又はFADH₂）を破壊することはない。同様に、高温下及び高ヘマトクリット試料に対して亜硝酸塩が効果的である。亜硝酸ナトリウムは高水溶性を有し、毒性がなく、さらに比較的安価であることから、亜硝酸ナトリウムが好ましい。

【0029】任意に、試薬は安定剤を含むものであってもよい。安定剤としては、例えば二価の金属塩が挙げられる。

【0030】好ましい実施形態において、この発明の試薬はキューベット等のウェットケミカルモードで使用することもできるが、本発明は全血内のβ-ヒドロキシブチレート又はグルコースを分析するための乾燥細片を提供する。細片は、単一層構造又は2層構造のいずれであってもよい。2層構造の細片は、好ましくはナイロンからなる膜の試験用パッドを有しており、このパッドは支持体と最上層との間に置かれる。支持体は、好ましくはポリエステルシートからなる。最上層は、メッシュ又は当業者に知られている任意の吸収性材料とすることができ、好ましい材料は、メチルオレオイルタウレートナトリウムで処理された多孔性ポリエチレンであり、ポアレックス社（Porex Corp., Fairburn, GA）から入手可能である。この材料を我々は「ポアレックス（Porex）」と呼ぶ。好ましくは、試験用パッドはプラスに帯電した面を有する。より好ましくは、試験用パッドはポリアミドである。試験用パッドは、グルコース酸化酵素（フラビン補助因子を含む）、PMS（又はその類似体の1つ）、及びWST-5で構成される試薬を含有する（以下の表1を参照されたい）。ポアレックスからなる最上層は亜硝酸塩試薬を含む（以下の表2を参照されたい）。

【0031】単一層構造の細片では、ポアレックスからなる層が除かれており、また亜硝酸塩を含む試薬全体（以下の表3を参照されたい）が試験用パッドに適用されている。ここで注目すべきことは、2層構造の細片及び単一層構造の細片の両方において、フラビンが結合しているフラビン依存性酵素又はフラビンが結合していないフラビン依存性酵素のいずれを使用してもよい。後者の場合、フラビン補助因子（例えば、FMN又はFAD）が添加される。

【0032】試験への使用においては、ユーザは一滴の全血をポアレックス最上層の上面に塗布する。全血又は溶血した血液がポアレックス最上層の上面と接触する

と、亜硝酸ナトリウムが再構成されて、反応可能な遊離ヘモグロビンと反応し、それにより分析に対してヘモグロビンの悪影響がなくなる。結果として生ずる、実質的にヘモグロビン無しの試料が毛細管現象又は重力によって下方の試験用パッドに移される。試験用パッド上では、試料がカスケード反応を開始し、色付いた染料を生成する。この染料の濃度は試料中に含まれる分析物濃度に比例し、光度計によって直接測定することができる。図4は、グルコース酸化酵素及びPMSを用いたグルコースに対する反応を示すグラフである。

【0033】図5及び図6は、60%ヘマトクリットを有する血液試料の時間経過に伴う光学濃度の変化を示すグラフであり、血液試料はグルコース含有量が0mg/dlの血液試料と100mg/dlの血液試料とを用い、さらにどちらの場合も亜硝酸塩を含むものと含まないものを用いた。図5のグラフに示す結果は、35℃で得られたものである。また、図6のグラフに示す結果は、室温（RT）で得られたものである。各々の場合において、亜硝酸塩濃度を5g/dlとした。亜硝酸塩が血液試料に含まれない場合、ヘモグロビンによってテトラゾリウムが還元され、染料の濃度が連続的に増加し、それに対応して光学濃度が増加する。亜硝酸塩がヘモグロビン（酸化によって）を除去することによって、試料中に含まれるグルコースからのみに色形成を制限する。図5及び図6のグラフに示すデータの生成に使用した2層構造の細片の調製は、後述の実施例1で説明する。

【0034】図7は、単一層構造の細片に対するグルコース/グルコース酸化酵素系での色形成反応に対する亜硝酸塩の効果を示すグラフである。血液試料は、どれも60%ヘマトクリットを有し、グルコースの濃度が0mg/dl又は200mg/dl、さらに亜硝酸塩が0mg/dl又は20mg/dlである。これらの試料は、室温で実験した。図7のグラフによれば、この系は室温で有効であり、ヘマトクリットは最高60%である。使用した単一層構造の細片の調製は、後述の実施例2に示す。

【0035】以下の実施例は本発明の好ましい実施形態を実証する。実施例1では、2層構造の細片を使用し、分析物はグルコース、さらに酵素はグルコース酸化酵素を用いた。実施例2では、単一層構造の細片を使用した。既に述べたように、分析物はグルコース、さらに酵素はグルコース酸化酵素を用いた。いずれの場合も既に挙げた他の分析物と酵素との組み合わせ（例えば、文献：Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd Ed., ed. by C. Burtis et al., W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA, 1994年、第976頁乃至第978頁及び第1174頁乃至第1175頁を参照されたい）に適用させるために組成の変更を容易に行うことができる。なお、実施例1及び実施例2は本発明を限定することを意図したものではない。

【0036】

【実施例】実施例1

パルコーポレーション (Pall Corporation, East Hills, NY) から得た0.8 μ mのナイロン膜を十分にしみ込むまで表1の試薬に浸した。過剰の試薬はガラス棒によって優しくこすり取った。得られた膜を56℃のオーブンに10分間置くことによって乾燥させた。ポレックス (0.6mm厚) を表2の亜硝酸溶液に浸し、続いて100℃のオーブンに10時間置くことによって乾燥させた。最後に、膜をポリエステルストック (0.4mm*10

*メレネックス (Melenex (登録商標)) ポリエステル、ICIアメリカ (ICI America, Wilmington, DE) から入手) と亜硝酸塩を含浸したポレックスとの間に積層した。

【0037】実施例2

最初に表3の試薬に浸す点と、ポレックスが不要であることから第2の浸漬は行わない点とを除いて、実施例1の手順を繰り返した。

【0038】

【表1】

グルコース試験パッド用試薬

成分	量
水	100 ml
(2-[モルホリノ]エタンスルホン酸)ナトリウム塩 MES (分子量 217.2、シグマ(Sigma, St. Louis, MO, USA)) 6M HCl 添加によりpH 5~7に調整	2.2 g
テトニック 1307 (BASF コーポレーション(BASF Corporation, Mount Olive, New Jersey, USA))	1~3 g
PSSA、ポリスチレンスルホン酸、ナトリウム塩 (分子量 70,000、ポリサイエンス社(Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA))	2~4 g
クロテイン (クロダ社(Croda Inc., Parsippany, NJ, USA))	2~4 g
マンニトール (分子量 182、シグマ(Sigma, St. Louis, MO, USA))	1~10 g
フェナジンメトサルフェート (PMS, 分子量 306.34、シグマ (Sigma, St. Louis, MO, USA))	30~300 mg
WS T-5 (分子量 1331.37、同仁化学研究所)	0.8~4 g
グルコースオキシダーゼ (GO、東洋紡製)	100~1,000 KU

【0039】

※ ※ 【表2】

亜硝酸試薬

成分	量
10 mM リン酸緩衝食塩水 pH 7.4、(P-3813、シグマ(Sigma, St. Louis, MO, USA))	70 ml
エタノール	30 ml
亜硝酸ナトリウム (分子量 69、アルドリッチケミカルズ (Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI, USA))	5 g
ポリビニルピロジン (分子量 40,000、シグマ(Sigma, St. Louis, MO, USA))	200 mg

【0040】

【表3】

成分	量
水	100 ml
(2-[-モルホリノ] エタンスルホン酸) ナトリウム塩 MES (分子量 217.2, シグマ(Sigma, St. Louis, MO, USA))	2.2 g
ガントレッツ (Gantrez) * 6%	20 ml
5.0% NaOH 添加によって pH 5.5 ~ 7 に調整	
トリトン X-305 (BASF コーポレーション (BASF Corporation, Mount Olive, New Jersey, USA))	0.5 ~ 2 g
マンニトール (分子量 182, シグマ(Sigma, St. Louis, MO, USA))	1 ~ 10 g
亜硝酸ナトリウム (分子量 69, アルドリッチケミカルズ (Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI, USA))	1 ~ 5 g
WST-5 (分子量 1331.37, 同仁化学研究所)	0.8 ~ 4 g
塩化マグネシウム (分子量 200, シグマ(Sigma, St. Louis, MO, USA))	3 ~ 5 g
フェナジメトスルフェート (PES, 分子量 334.4, シグマ (Sigma, St. Louis, MO, USA))	100 ~ 1,000 mg
グルコースオキシダーゼ (GO, 東洋紡績)	100 ~ 1,000 KU

* ガントレッツ AN-139 (ポリメチルビニルエーテル- α 1-無水マレイン酸、分子量 1,080,000、カタログ番号 41632-0、アルドリッチケミカルズ (Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI, USA)) 水に溶解して 6% ガントレッツ水溶液を調製し、9.5℃で 4.5 分未満加熱することで、使用可能な状態となったガントレッツ 6% が得られる。

【0041】好ましい実施態様は以下の通りである。

(1) 前記分析物はグルコースであり、また前記酵素はグルコース酸化酵素である請求項 1 に記載の試薬。

(2) 前記染料前駆体は水溶性である請求項 1 に記載の試薬。

(3) 前記電子転移剤はフェナジメト硫酸塩 (PMS) 又はその類似体を含む請求項 1 に記載の試薬。

(4) 二価の金属安定化剤をさらに含む請求項 1 に記載の試薬。

(5) 前記染料前駆体は水溶性である請求項 2 に記載の試薬。

【0042】(6) 前記染料前駆体はフェナジメト硫酸塩 (PMS) 又はその類似体を含む請求項 2 に記載の試薬。

(7) 前記電子転移剤は二価金属安定化剤を含む請求項 2 に記載の試薬。

(8) 前記試験用パッドはプラスに帯電した面を有する請求項 3 に記載の乾燥試薬細片。

(9) 前記試験用パッドはポリアミドを含む請求項 3 に記載の乾燥試薬細片。

(10) 前記試験用パッドを覆う吸収性の最上層をさらに有する請求項 3 の乾燥試薬細片。

【0043】(11) 前記最上層は吸収性である請求項 5 に記載の乾燥試薬細片。

(12) 前記最上層と前記試験用パッドとの間に、スペーサと、毛管現象経路をなす溝とをさらに有する請求項 5 に記載の乾燥試薬細片。

(13) 前記分析物はグルコースであり、前記酵素はグルコース酸化物である請求項 5 の乾燥試薬細片。

(14) 前記テトラゾリウム染料前駆体は、2, 2'-ジベンゾチアゾリル-5, 5'-ビス[4-ジ(2-スルホエチル)カルバモイルフェニル]-3, 3'-ジ(3, 3'-ジメトキシ-4, 4'-ビフェニレン)ジテトラゾリウム、ジナトリウム塩 (WST-5) である請求項 5 に記載の乾燥試薬細片。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明にもとづく試験用細片の斜視図である。

30 【図 2】本発明にもとづく別の試験用細片の分解組立図である。

【図 3】本発明にもとづくさらに別の試験用細片の分解組立図である。

【図 4】本発明にもとづくグルコース分析の化学反応を説明するための模式図である。

【図 5】2 層構造の試験用細片を用いた分析 (35℃) によるヘモグロビン抑制剤としての亜硝酸塩の効果を示すグラフである。

【図 6】2 層構造の試験用細片を用いた分析 (室温) によるヘモグロビン抑制剤としての亜硝酸塩の効果を示すグラフである。

【図 7】1 層構造の試験用細片を用いた分析 (室温) によるヘモグロビン抑制剤としての亜硝酸塩の効果を示すグラフである。

【符号の説明】

10 試験用細片

12 試験用パッド

14 支持体 (非吸収性層)

16 最上層 (非吸収性層)

50 18 窓又はスルーホール

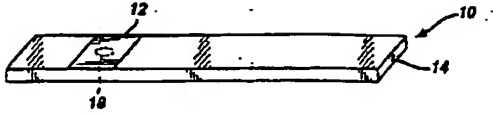
(9)

特開2001-292795

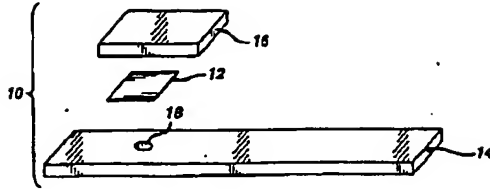
15
20 スペーサ
22 溝

16
* 24 開口部
* 26 測定領域

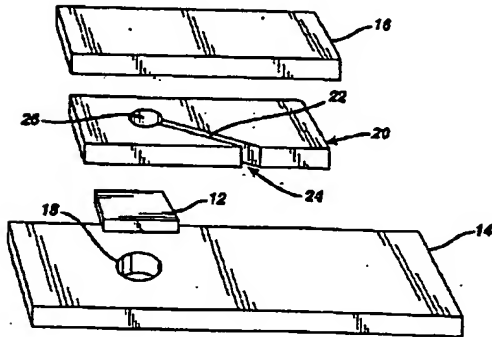
【図1】



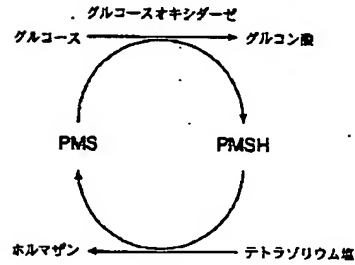
【図2】



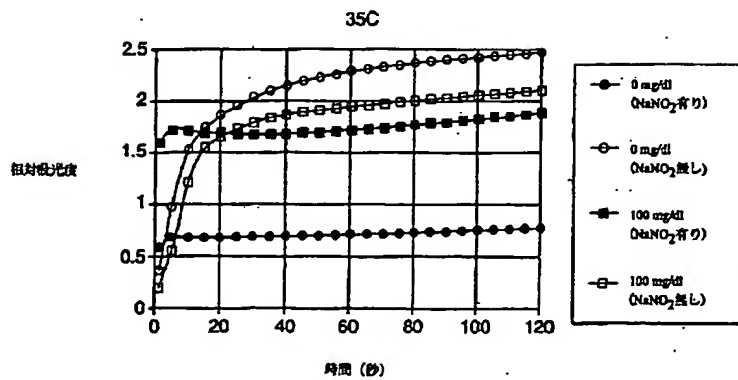
【図3】



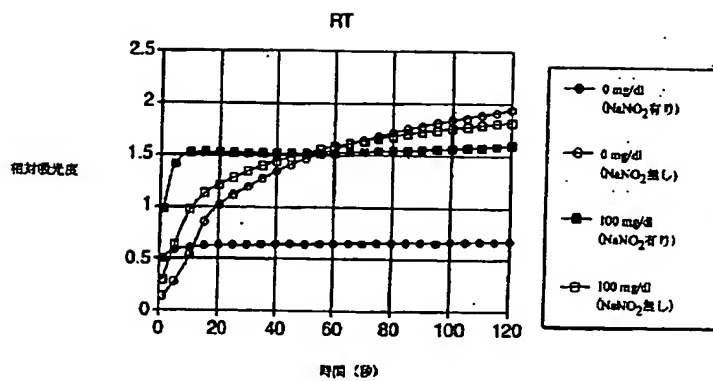
【図4】



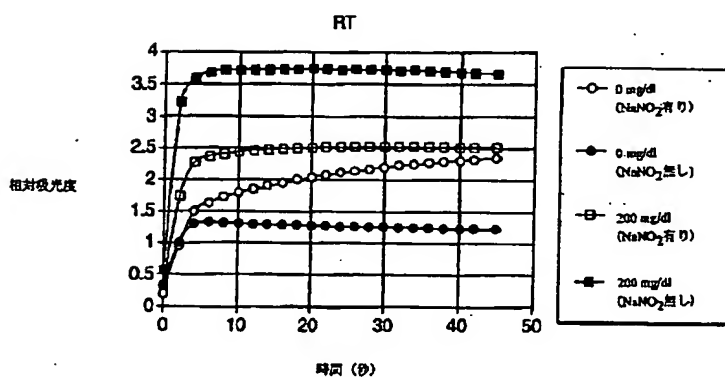
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(71)出願人 596159500

1000 Gibraltar Drive,
Milpitas, California
95035, United States
of America

(72)発明者 イェン・シュ・ユ

アメリカ合衆国、94506 カリフォルニア
州、プレザントン、パセオ・ロブルズ
3158

【外国語明細書】

1. Title of Invention

DIAGNOSTICS BASED ON TETRAZOLIUM COMPOUNDS

2. Claims

1. A reagent for measuring a concentration of an analyte in a hemoglobin-containing biological fluid, comprising
 - a) a flavin-dependent enzyme that has a flavin bound to it and that has specificity for the analyte,
 - b) a tetrazolium dye precursor,
 - c) an electron transfer agent, and
 - d) a nitrite salt.
2. A reagent for measuring a concentration of an analyte in a hemoglobin-containing biological fluid, comprising
 - a) a flavin-dependent enzyme that has specificity for the analyte and does not have a flavin bound to it,
 - b) flavin mononucleotide (FMN) or flavin adenine dinucleotide (FAD).
 - c) a tetrazolium dye precursor,
 - d) an electron transfer agent, and
 - e) a nitrite salt.
3. A dry reagent strip for measuring a concentration of an analyte in a hemoglobin-containing biological fluid comprising a support layer on which is a test pad and a top layer overlaying the test pad in which a first part of the reagent of claim 1 is on the test pad and a second part of the reagent is on the support and/or top layer.

4. A dry reagent test strip for measuring a concentration of glucose in a hemoglobin-containing biological fluid, comprising

- a) a support layer,
- b) on the support layer, a test pad having a coating that comprises
 - i) glucose oxidase that has a flavin bound to it,
 - ii) a tetrazolium dye precursor, and
 - iii) PMS or an analog thereof, and
- c) on the test pad, a bibulous top layer that is coated with a nitrite salt.

5. A dry reagent test strip for measuring a concentration of glucose in a hemoglobin-containing biological fluid, comprising

- a) a support layer,
- b) on the support layer, a test pad having a coating that comprises
 - i) a flavin-dependent enzyme that does not have a flavin bound to it,
 - ii) FMN or FAD,
 - iii) a tetrazolium dye precursor, and
 - iv) PMS or an analog thereof, and
- c) on the test pad, a bibulous top layer that is coated with a nitrite salt.

3. Detailed Description of Invention

Cross-reference to Prior Application

This is a continuation-in-part of copending U.S. Application Serial No. 09/282,083, filed on March 30, 1999, which is a continuation-in-part of U.S. Application Serial No. 09/161,876, filed on September 28, 1998, now U.S. Patent No. 5,902,731.

Background of Invention

1. Field of the Invention

This invention relates to diagnostic compositions that permit the measurement of analyte concentrations in hemoglobin-containing biological fluids. The compositions are based on tetrazolium dye precursors and involve suppressing the hemoglobin-induced reduction of them.

2. Description of the Related Art

Adipose tissue is one of the most abundant forms of energy storage in the body. It releases stored fatty acids into the circulatory system to be metabolized primarily by the liver. In the process, fat is consumed and energy is released and made available to the body. Normally, little fat is consumed, the fatty acids are completely metabolized to carbon dioxide and water, and the conversion does not upset the delicate pH balance of the body. However, if insufficient amounts of carbohydrates are present in the body, due, for example, to dieting, then fat consumption and fatty acid production can increase to potentially harmful levels. In addition to dieters, insulin-dependent patients are vulnerable, because of their impaired carbohydrate metabolism. When excessive fatty acid is used to supply a body's energy demand, then large quantities of acetoacetate, acetone, and beta-hydroxybutyrate are produced. These intermediates are referred to as ketone bodies, and the condition is known as ketoacidosis.

The ketone bodies can normally be recycled into other forms by the body, provided it is not overwhelmed. Therefore, a healthy individual accumulates a negligible amount of these analytes. When a large quantity of fats

is being metabolized in a relatively short period or when most of the energy is derived from fats, massive amounts of ketone bodies are produced. Excessive production of these fat metabolites can cause certain neurologic disorders, if the problem is not corrected promptly.

Ketone bodies are present in blood and, if a threshold is exceeded, are excreted via the urine. They are easily detected by a modern clinical analyzer. On average, the percentages of beta-hydroxybutyrate, acetoacetate, and acetone are 78%, 20% and 2%, respectively. Because of its relatively low concentration and high volatility, acetone is seldom measured. Instead, acetoacetate is quantitatively determined by a nitroprusside reaction and the beta-hydroxybutyrate is quantified with an enzymatic method. Acetoacetate test strips have been available for decades. They are based on a nitroprusside ion coupling reaction with aldehydes and ketones. An alkaline urine sample or a serum specimen is allowed to react with the nitroprusside for some minutes, and a purple color is developed. The intensity of the color indicates the acetoacetate concentration. However, acetone interferes with the test, resulting in higher readings. Further, as the patient recovers from a ketoacidosis episode, the acetoacetate level in urine and in blood increases, thus making the diagnosis difficult.

The beta-hydroxybutyrate test is more useful for monitoring ketone body concentrations. It is based on the oxidation of beta-hydroxybutyrate with the corresponding dehydrogenase in the presence of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) cofactor. (Strictly speaking, only D-beta-hydroxybutyrate is naturally present and oxidized, but we omit the "D" for brevity throughout this specification and the appended claims.) Upon the oxidation, NADH is produced, and its concentration is measured directly with a UV spectrophotometer. Hence, the corresponding signal change in the spectrum is proportional to the analyte's concentration. Unfortunately, the excitation of NADH occurs in the UV region; thus, this mode of detection is suitable only for laboratory instruments. Another method for monitoring beta-hydroxybutyrate is by oxidizing the NADH with a tetrazolium compound.

Tetrazolium compounds are generally very sensitive to strong bases and to light. Thus, special care must be exercised to ensure the integrity of these compounds. Nevertheless, tetrazoliums have played an important role in studies of tissue metabolism. For example, this class of compounds has been used in probing anaerobic oxidation and reduction reactions in cells. Further, they are commonly used in clinical diagnostics. The compounds are

typically light-colored or colorless compounds that undergo a reduction reaction, in the presence of a reducing agent, to yield a highly colored formazan. Reducing agents such as ascorbates, sulfhydryls, or variants of NADH, NADPH, PQQH₂ (reduced PQQ - pyrrolo-quinoline quinone), FMNH₂ (reduced FMN - flavin mononucleotide), and FADH₂ (reduced FAD - flavin adenine dinucleotide) are capable of forming the dye.

In clinical diagnostics, these dyes have been found to be invaluable for monitoring the formation of NAD(P)H from their parent compounds, NAD(P)⁺, in anaerobic reactions. (See, for example, U.S. Pat. 5,360,595, issued on November 1, 1994 to D. Bell et al.) The redox reaction is rapid and is not sensitive to oxygen. The resulting dye color is very intense and has low solubility in water.

In principle, tetrazolium dye precursors can be used to measure ketone bodies and glucose in whole blood. However, the tetrazolium can be reduced non-enzymatically by hemoglobin (Fe(II)) to form a colored formazan, if the hemoglobin is not contained within the red cells of the blood. Thus, free hemoglobin causes serious interference with the measurements. In fact, due to hemolysis and the resultant abundance of free hemoglobin relative to the analyte of interest, in a typical ketone body measurement, the interfering signal from hemoglobin could exceed the

intended signal. Glucose measurements, particularly in the normal concentration or above, are not affected as adversely. When the reaction is carried out in high hematocrit samples or at a higher temperature, where the hemoglobin oxidation reaction is faster, interference with glucose measurements is significant, as well. Since the hemolysis of red blood cells, which causes free hemoglobin to be present, cannot easily be avoided, red blood cells must be removed from samples prior to testing, if tetrazolium is to be used for the analysis.

Red blood cells can be removed from samples by filtering with membranes and filters, by trapping with chemical reagents, or by a combination of both methods. Filtration methods for separating red cells from whole blood are costly and require rather large sample volumes. An example of a blood ketone (beta-hydroxybutyrate) test that uses filtration to eliminate red cells from a whole blood sample is the KetoSite® test available from GDS Diagnostics, Elkhart, IN. (See Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd Ed., ed. by C. Burtis et al., W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA, 1994, p. 974.) The "Test Card" used in that test has two filter layers, which makes the card rather costly and necessitates a large (25µL) blood sample. Further, the blood must not be hemolyzed.

A combination of filtration and chemical trapping is used in the Ames® Glucometer Encore™ blood glucose strip, available from Miles. That strip uses a layer of filter material and an agglutination aid (potato lectin) to eliminate interference from red cells. (See Chu et al., European Pat. Appl. 0 638 805 A2, publ. Feb. 15, 1995.)

Introducing an oxidizing agent into a system, to oxidize the hemoglobin to methemoglobin, is another way to reduce the hemoglobin interference. Although ferricyanides are known to transform hemoglobin to methemoglobin, they also destroy the desired product, NADH.

Palmer et al., EPO 0 330 517 B2, published on Aug. 30, 1989, disclose a method for measuring biochemical analytes that involves reacting the analyte with an oxidase enzyme capable of electron transferase activity with the analyte to yield reduced enzyme. The enzyme is colorimetrically assayed to determine the analyte concentration. The enzyme reaction is not oxygen-dependent.

Freitag et al., WO 94/01544, published on January 20, 1994, disclose a stable reagent for analyte analysis. The reagent includes an enzyme, a phenazine derivative, a tetrazolium salt, and a divalent metal salt to stabilize the reagent.

Storhoff et al., WO 94/01578, published on January 20, 1994, also disclose a stable reagent for analyte analysis. The reagent includes an enzyme, a mediator, a tetrazolium salt, and an oxidizing agent that stabilizes the reagent.

Summary of the Invention

The present invention provides a reagent for measuring the concentration of an analyte in a hemoglobin-containing biological fluid. The reagent comprises:

- a) a flavin-dependent enzyme that has a flavin bound to it and that has specificity for the analyte,
- b) a tetrazolium dye precursor,
- c) an electron transfer agent, and
- d) a nitrite salt.

In an alternative embodiment of the invention, the reagent comprises;

- a) a flavin-dependent enzyme that has specificity for the analyte and does not have a flavin bound to it,
- b) flavin mononucleotide (FMN) or flavin adenine dinucleotide (FAD),
- c) a tetrazolium dye precursor,
- d) an electron transfer agent, and
- e) a nitrite salt.

The reagent is particularly suited for coating onto one or more substrates to form a dry reagent strip for measuring an analyte concentration in a hemoglobin-containing biological fluid. A particularly preferred strip comprises

- a) a support layer,
- b) on the support layer, a test pad having a coating that comprises
 - i) a flavin-dependent enzyme that has a flavin bound to it and that has specificity for the analyte,
 - ii) a tetrazolium dye precursor, and
 - iii) an electron transfer agent, and
- c) on the test pad, a bibulous top layer that is coated with a nitrite salt.

Another strip of the invention comprises

- a) a support layer,
- b) on the support layer, a test pad having a coating that comprises
 - i) a flavin-dependent enzyme that has specificity for the analyte and does not have a flavin bound to it,
 - ii) FMN or FAD,
 - iii) a tetrazolium dye precursor,
 - iv) an electron transfer agent, and
- c) on the test pad, a bibulous top layer that is coated with a nitrite salt.

Detailed Description of the Invention

The present invention provides a reagent for measuring analyte concentration in hemoglobin-containing biological fluids (such as whole blood), by producing a concentration of the reduced form of a cofactor, such as NADH, NAD(P)H, PQQH₂, FMNH₂, or FADH₂ that is a measure of

the analyte concentration. Inclusion of nitrite in the reagent overcomes the interference of hemoglobin with the measurement of the reduced cofactor concentration. It is particularly useful for, but not limited to, measurement of ketone bodies and glucose.

Fig. 1 depicts a typical test strip 10 of the invention, which consists of a test pad 12 affixed onto a support 14. The support may be a plastic - e.g., polystyrene, nylon, or polyester - or metallic sheet or any other suitable material known in the art. The test pad is coated with a reagent that reacts with the analyte to cause a color change. The test pad preferably comprises a bibulous material, such as filter paper or polymer membrane. However, since the reaction doesn't require oxygen, the test pad may be a non-bibulous material, such as plastic film. The reagent includes an enzyme that is specific to the analyte, a hydride transfer agent, a tetrazolium dye precursor, a suitable enzyme cofactor, and a hemoglobin suppressor. Optionally, a buffer and stabilizer are included for greater stability.

As shown in Fig. 2, the test strip can also be a multilayer construction, with top layer 16 overlaying test pad 12. In that construction, the reagent may be divided between the two layers. For example, the hemoglobin suppressor may be coated onto optional top layer 16 and

the balance of the reagent coated onto test pad 12. Preferably, top layer 16 is bibulous and serves as a spreading layer and as an absorbent layer to absorb excess sample. Sample is applied to top layer 16, and it passes through to test pad 12. The analyte concentration is determined by measuring the color change through support layer 14 or, if layer 14 is not transparent where it adjoins the reaction area, through optional window or through-hole 18.

In the alternative embodiment shown in Fig. 3, spacer 20 separates top layer 16 and test pad 12. Spacer 20 is preferably a non-bibulous plastic film having an adhesive coating (not shown) on both faces. Channel 22 in spacer 20 provides a capillary path for sample to flow from opening 24 to measurement area 26. The flow depends on air venting between a surface of test pad 12 and an adjoining layer or, alternatively, through optional vent 18. The color change in measurement area 26 is monitored through optional vent/window 18. Reagent may all be on test pad 12 or, alternatively, may be divided among the test pad and one or both of non-bibulous layers 14 and 16. Thus, a first part of the reagent may be on the test pad and a second part of the reagent may be on one or both of the non-bibulous layers. When we refer to reagent as being a "coating" or "on" a layer, we intend to include

the possibility that reagent will be absorbed into the layer, particularly if it is bibulous.

All flavin-dependent enzymes are suitable for assays with this invention. Suitable oxidase enzymes and their corresponding analytes include: alcohol oxidase for alcohol, glucose oxidase for glucose, galactose oxidase for galactose, cholesterol oxidase for cholesterol, L-lactate oxidase for L-lactate, urate oxidase for uric acid, bilirubin oxidase for bilirubin, and choline oxidase for choline. Suitable dehydrogenase enzymes and the corresponding analytes include: pyruvate dehydrogenase for pyruvate, D-lactate dehydrogenase for D-lactate, and succinate dehydrogenase for succinate.

When not bound to the enzyme, a cofactor must be added to activate the enzyme. Cofactors that may be added to a flavin-dependent enzyme include: flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD). In the presence of the enzyme, the analyte reduces the cofactor.

The next step in the dye-forming process is hydride abstraction from the reduced cofactor by an electron transfer agent. Suitable electron transfer agents include diaphorase, such as lipoic dehydrogenase, ferredoxin-NADP reductase, and lipoamide dehydrogenase. More preferred, when a flavin cofactor is used, are non-enzymatic electron

transfer agents, such as phenazine methosulfate (PMS), phenazine ethosulfate (PES), 1-methoxyphenazine methosulfate, or Meldola Blue. Reaction kinetics and stability are the primary factors for selecting an electron transfer agent or "hydride abstractor". For example, PMS is the universal hydride abstractor, because it has relatively fast reaction kinetics with most of the tetrazolium compounds listed below. For that reason, it is preferred when the cofactor is PQQ. PMS is, however, more sensitive to light than enzyme-based hydride abstractors. Diaphorase is more stable and, for that reason, is preferred when the cofactor is NAD.

The captured hydride is transferred to a tetrazolium compound (dye precursor) to form a colored formazan. Tetrazolium compounds that are most suitable for this device are: 2-(2'-benzothiazolyl)-5-styryl-3-(4'-phthalhydrazidyl) tetrazolium (BSPT), 2-benzothiazolyl-(2)-3,5-diphenyl tetrazolium (BTDP), 2,3-di(4-nitrophenyl) tetrazolium (DNP), 2,5-diphenyl-3-(4-styrylphenyl) tetrazolium (DPSP), distyryl nitroblue tetrazolium (DS-NBT), 3,3'-(3,3'-dimethoxy-(1,1'-biphenyl)-4,4'-diyl)-bis[2-(4-nitrophenyl)-5-phenyl]-2H tetrazolium (NBT), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium (MTT), 2-phenyl-3-(4-carboxyphenyl)-5-methyl tetrazolium (PCPM), tetrazolium blue (TB), thiocarbamyl nitroblue

tetrazolium (TCNBT), tetranitroblue tetrazolium (TNBT), tetrazolium violet, (TV), 2-benzothiazothiazolyl-3-(4-carboxy-2-methoxyphenyl)-5-[4-(2-sulfoethylcarbamoyl)phenyl]-2H-tetrazolium (WST-4), and 2,2'-dibenzothiazolyl-5,5'-bis[4-di(2-sulfoethyl)carbamoylphenyl]-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylene)ditetrazolium, disodium salt (WST-5). Preferably, water-soluble dye precursors, more preferably WST-5, are used so as to be compatible with biological samples. Further, when WST-5 is used, the resulting formazan compound exhibits strong spectral absorption at the purple-blue region, thus reducing the need for correcting the background signal from hemoglobin.

Finally, a hemoglobin suppressor is present in the reagent to curtail the undesirable dye-forming reaction between hemoglobin and the tetrazolium compound. The role of the hemoglobin suppressor is to oxidize the hemoglobin to methemoglobin, which does not react with the tetrazolium or formazan. Surprisingly, nitrite salts, such as sodium nitrite, potassium nitrite, and their derivatives, are very effective in suppressing the hemoglobin, while not destroying the reduced cofactor (such as NADH, PQQH₂, FMNH₂, or FADH₂). The nitrites are effective, as well, at elevated temperature and with high hematocrit samples. Sodium nitrite is preferred, because

it has high aqueous solubility, is not toxic, and is relatively inexpensive.

Optionally, the reagent may also include a stabilizer, such as a divalent metal salt.

Although the reagent of this invention can be used in a wet chemical mode, such as in a cuvette, in preferred embodiments, the invention provides dry strips for assaying beta-hydroxybutyrate or glucose in whole blood. Strips may be either single-layer or two-layer. A two-layer strip consists of a membrane test pad, preferably of nylon, that is placed between a support and a top layer. The support is preferably of polyester sheet. The top layer can be a mesh or any bibulous material known in the art. A preferred material is a porous polyethylene treated with sodium methyl oleoyl taurate, available from the Porex Corp. of Fairburn, GA. We refer to this material as "Porex". Preferably, the test pad has a positively-charged surface. More preferably, the test pad is polyamide. The test pad contains a reagent comprising glucose oxidase (including a flavin cofactor), PMS (or one of its analogs), and WST-5 (Table 1, below). The Porex top layer contains a nitrite reagent (Table 2).

In a single-layer strip, the Porex layer is omitted, and the entire reagent, including the nitrite (Table 3), is applied to the test pad. Note that in both the two-

layer and single-layer strip, either a flavin-dependent enzyme that has a flavin bound to it or a flavin-dependent enzyme that does not have a flavin bound to it may be used. In the latter case, a flavin cofactor (e.g. FMN or FAD) is added.

In operation, a user applies a drop of whole blood to the upper surface of the Porex top layer. As the whole blood or lysed blood comes into contact with the Porex, the sodium nitrite is reconstituted and reacts with the available free hemoglobin, thus rendering the hemoglobin harmless to the assay. The resulting, substantially hemoglobin-free sample is transferred to the test pad below, via capillary or gravitational force. On the test pad, the sample initiates the cascade reaction to yield a colored dye, whose concentration is proportional to the analyte concentration in the sample and can be determined directly with a photometer. Fig. 4 depicts the reaction for glucose, using glucose oxidase and PMS.

Fig. 5 depicts the change in optical density over time of blood samples, all having 60% hematocrit and containing 0 and 100 mg/dL of glucose, both with and without nitrite. The top graph displays results at 35°C. The bottom graph displays results at room temperature (RT). In each case, the nitrite concentration was 5 g/dL. In the absence of nitrite, hemoglobin reduces the

tetrazolium to form a continuously increasing dye concentration, with a corresponding increase in optical density. Nitrite, by removing the hemoglobin (by oxidation), limits the color formation to that which results solely from the glucose in the sample. Preparation of the two-layer strip that was used to generate the data depicted in the graphs is described in Example 1, below.

Fig. 6 shows the effect of nitrite on the color-forming reaction in the glucose/glucose oxidase system for a single-layer strip. Blood samples, all having 60% hematocrit, contained 0 or 200 mg/dL of glucose and 0 or 20 mg/mL of nitrite. The samples were run at room temperature. The graph shows that the present system is effective at room temperature and hematocrit up to 60%. Preparation of the single-layer strip that was used is described in Example 2, below.

The following examples demonstrate preferred embodiments of the present invention. In Example 1, a two-layer strip was used, the analyte is glucose, and the enzyme is glucose oxidase. In Example 2, a single-layer strip was used. As before, the analyte is glucose and the enzyme is glucose oxidase. The compositions can readily be modified for application to other analyte-enzyme combinations listed earlier. (See, for example, Tietz

Textbook of Clinical Chemistry, 2nd Ed., ed. by C. Burtis et al., W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA, 1994, pp 976-978 and 1174-1175.) The examples are not intended to be in any way limiting.

EXAMPLE 1

A 0.8 μ m nylon membrane obtained from Pall Corporation (East Hills, NY) was dipped into the reagent of Table 1, until saturated. The excess reagent was scraped off gently with a glass rod. The resulting membrane was hung to dry in a 56° C oven for 10 minutes. Porex (0.6 mm thick) was soaked in the nitrite solution of Table 2 and then hung to dry in a 100° C oven for ten hours. Finally, the membrane was laminated between a polyester stock (0.4 mm Melenex® polyester from ICI America, Wilmington, DE) and the nitrite-impregnated Porex.

EXAMPLE 2

The procedure of Example 1 was repeated, except that the first dip was the reagent of Table 3, and there was no second dip, since the Porex was not needed.

Table 1. Reagent for a Glucose Test Pad

Components	Quantity
Water	100 ml
(2-[-Morpholino]ethanesulfonic acid) sodium salt MES (MW 217.2, Sigma, St. Louis, MO, USA) Adjust pH to 5-7 by adding 6 M HCl)	2.2 gm
Tetonic 1307 (BASF Corporation, Moun Olive, New Jersey, USA)	1-3 gm
PSSA, Polystyrenesulfonic acid, sodium salt (MW 70,000, Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA)	2-4 gm
Crotein (Croda Inc., Parsippany, NJ, USA)	2-4 gm
Mannitol (MW 182, Sigma, St. Louis, MO, USA)	1-10 gm
Phenazine Methosulfate (PMS, MW 306.34, Sigma, St. Louis, MO, USA)	30-300 mg
WST-5 (MW 1331.37, Dojindo)	0.8-4 gm
Glucose Oxidase (GO, TOYOBO)	100-1000KU

Table 2. Nitrite Reagent

Components	Quantity
10 mM Phosphate Buffer Saline, pH7.4, (P-3813, Sigma, St. Louis, MO, USA)	70 ml
Ethanol	30 ml
Sodium Nitrite (MW69, Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI, USA)	5 gm
Polyvinylpyrrodine (MW 40,000, Sigma, St. Louis, MO, USA)	200 mg

Table 3. Reagent for a Glucose Test Pad

Components	Quantity
Water	100 ml
(2-[-Morpholino]ethanesulfonic acid) sodium salt MES (MW 217.2, Sigma, St. Louis, MO, USA)	2.2 gm
Gantrez* 6%	20 mL
Adjust pH to 5.5-7 by adding 50% NaOH	
Triton X-305 (BASF Corporation, Moun Olive, New Jersey, USA)	0.5-2 gm
Mannitol (MW 182, Sigma, St. Louis, MO, USA)	1-10 gm
Sodium Nitrite (MW69, Aldirch Chemicals, Milwaukee, WI, USA)	1-5 gm
WST-5 (MW 1331.37, Dojindo)	0.8-4 gm
Magnesium Chloride (MW 203, Sigma, St. Louis, MO, USA)	3-5 gm
Phenazine Ethosulfate (PES, MW 334.4, Sigma, St. Louis, MO, USA)	100-1000 mg
Glucose Oxidase (GO, TOYOBO)	100-1000KU

*Gantrez AN-139 (Poly Methylvinylether-alt-Maleic Anhydride, MW 1,080,000, Cat# 41632-0, Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI, USA) Make 6% Gantrez in water, heat to 95 C for less than 45 min. to get Gantrez 6% which is ready to use.

4. Preferred aspects are provided as stated in the followings

- (1) The reagent of claim 1 in which the analyte is glucose and the enzyme is glucose oxidase.
- (2) The reagent of claim 1 in which the dye precursor is water-soluble.
- (3) The reagent of claim 1 in which the electron transfer agent comprises phenazine methosulfate (PMS) or an analog thereof.
- (4) The reagent of claim 1 further comprising a divalent metal stabilizer.
- (5) The reagent of claim 2 in which the dye precursor is water-soluble.
- (6) The reagent of claim 2 in which the electron transfer agent comprises (PMS) or an analog thereof.
- (7) The reagent of claim 2 further comprising a divalent metal stabilizer.
- (8) A dry reagent strip for measuring a concentration of an analyte in a hemoglobin-containing biological fluid comprising a support layer on which is a test pad having a coating of the reagent of claim 1.
- (9) A dry reagent strip for measuring a concentration of an analyte in a hemoglobin-containing biological fluid comprising a support layer on which is a test pad having a coating of the reagent of claim 2.

- (10) The strip of aspect(8) in which the test pad has a positively-charged surface.
- (11) The strip of aspect(8) in which the test pad comprises a polyamide.
- (12) The strip of aspect(8) further comprising a bibulous top layer overlaying the test pad.
- (13) A dry reagent strip for measuring a concentration of an analyte in a hemoglobin-containing biological fluid comprising a support layer on which is a test pad and a top layer overlaying the test pad in which a first part of the reagent of claim 2 is on the test pad and a second part of the reagent is on the support and/or top layer.
- (14) The strip of claim 3 in which the top layer is bibulous.
- (15) The strip of claim 3 further comprising a spacer and channel between the top layer and test pad to provide a capillary path between the top layer and pad.
- (16) The strip of claim 3 in which the analyte is glucose and the enzyme is glucose oxidase.
- (17) The strip of claim 3 in which the tetrazolium dye precursor is 2,2'-dibenzothiazolyl-5,5'-bis(4-di(2-sulfoethyl)carbamoylphenyl)-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylene)ditetrazolium, disodium salt (WST-5).

5. Brief Description of the Drawings

Fig. 1 is a perspective view of a test strip of this invention.

Fig. 2 is an exploded view of another test strip of this invention.

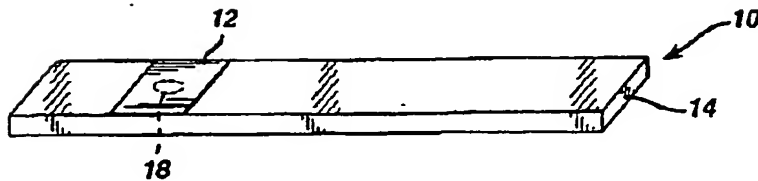
Fig. 3 is an exploded view of yet another test strip of this invention.

Fig. 4 is a pictorial depiction of the chemistry of a glucose assay of this invention.

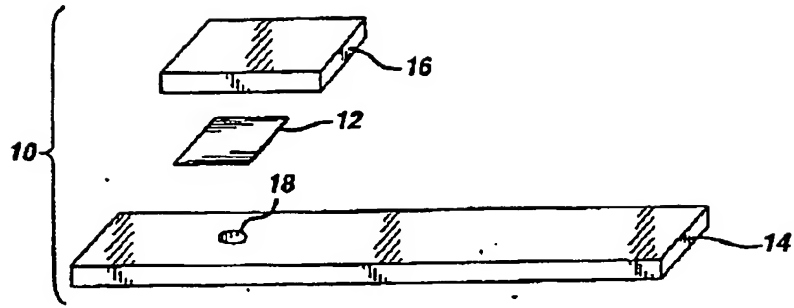
Fig. 5 is a graph that shows the effect of nitrite as a hemoglobin suppressor on a two-layer assay.

Fig. 6 is a graph that shows the effect of nitrite as a hemoglobin suppressor on a single-layer glucose assay.

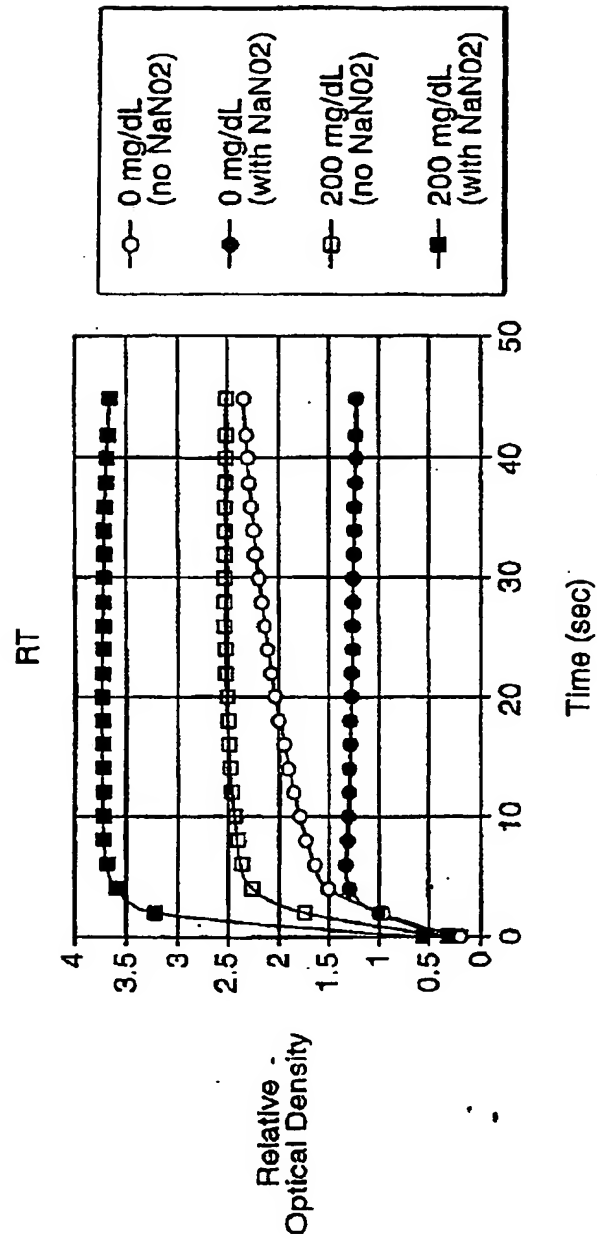
【図1】



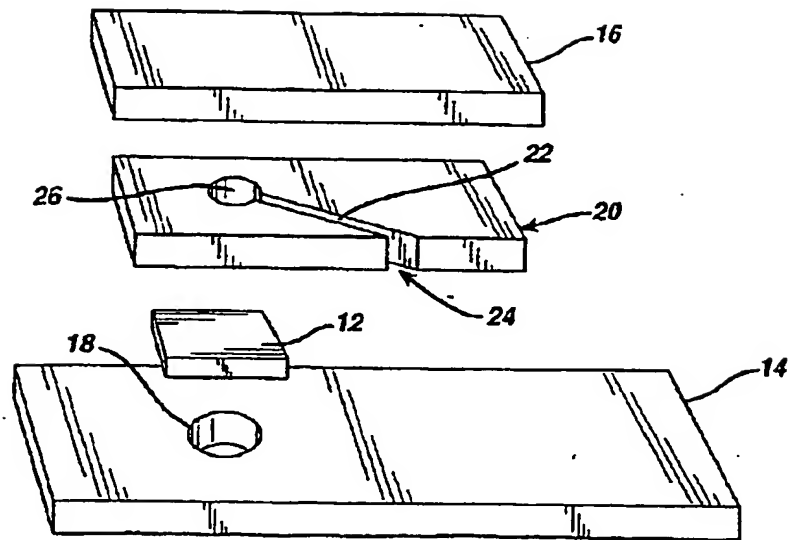
【図2】



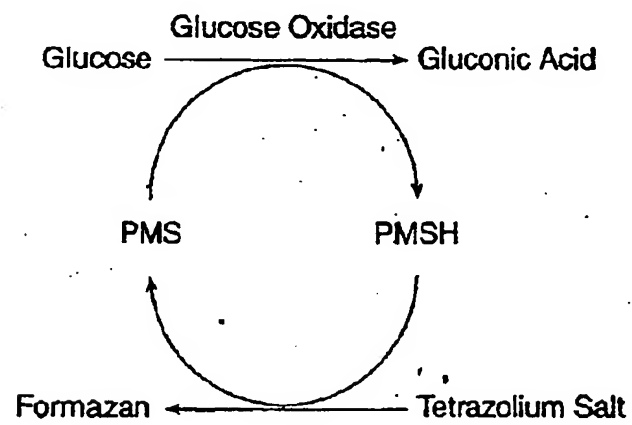
【図6】



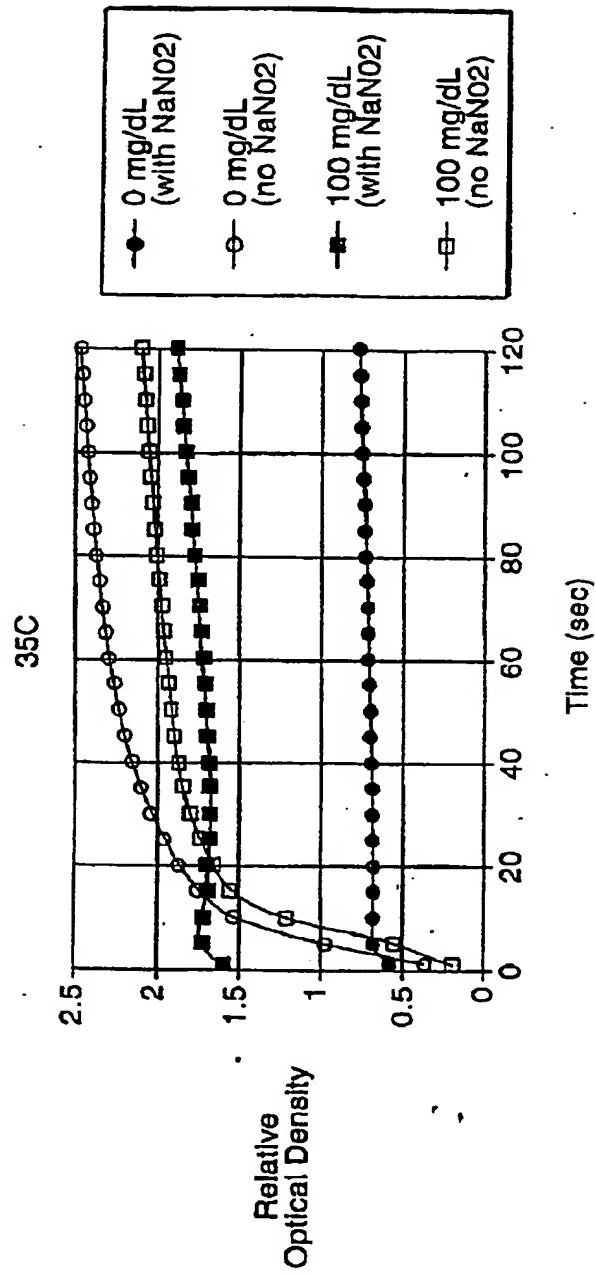
【図3】



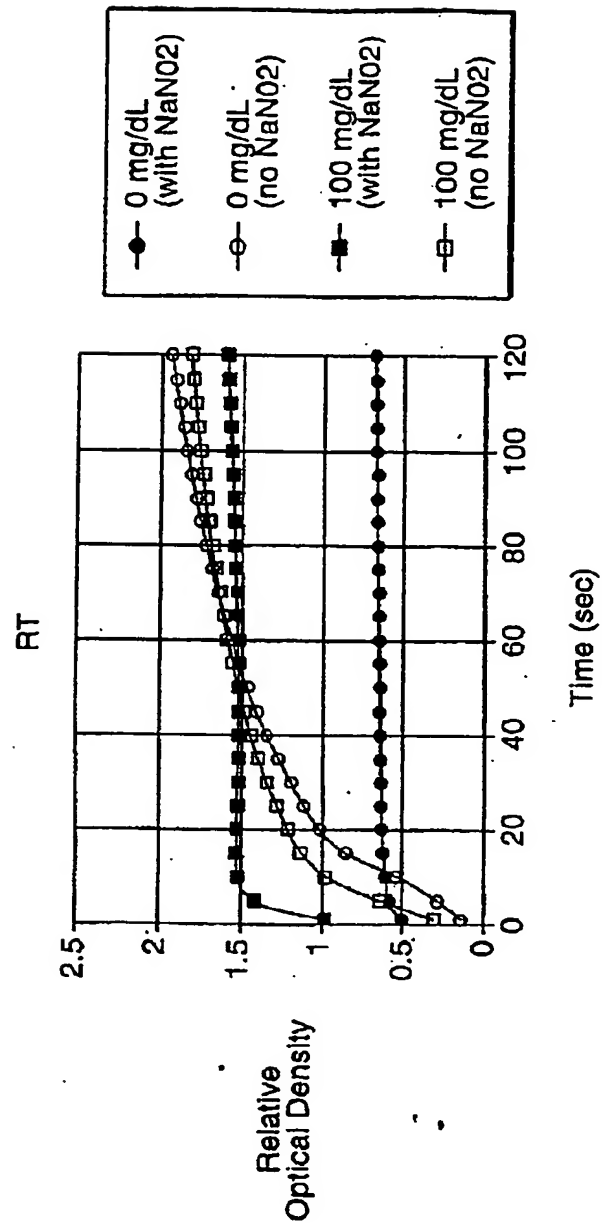
【図4】



【図5A】



【図5B】



1. Abstract

A reagent is suitable for measuring the concentration of an analyte in a hemoglobin-containing biological fluid, such as whole blood. The reagent comprises a flavin-dependent enzyme that has specificity for the analyte, a flavin cofactor if, and only if, a flavin is not bound to the enzyme, a tetrazolium dye precursor, an electron transfer agent, and a nitrite salt. The reagent causes dye formation that is a measure of the analyte concentration. The nitrite salt suppresses interfering dye formation caused non-enzymatically by the hemoglobin. Preferably, the reagent is used in a dry strip for measuring glucose in whole blood.

2. Selected Drawings

Fig.6